

国立科学博物館附属自然教育園におけるゲンジボタルの遺伝子解析

鈴木浩文*

日本ホタルの会

Hirobumi Suzuki: Mitochondrial DNA analysis of the firefly, *Luciola cruciata* in the Institute for Nature Study, National Museum of Nature and Science. Miscellaneous Reports of the Institute for Nature Study (53): 1-5, 2021.

Japan Fireflies Society

はじめに

自然教育園は、東京都港区白金台の国立科学博物館附属の自然緑地である。もともとは、江戸時代に下屋敷などに使われていたが、あまり人の手を入れていない状態が長く保たれていたこともあって、現在では、東京都内で自然の姿を残す貴重な場所となっている。2014年の調査では、約20ヘクタールの園内に、1473種の植物、約2130種の昆虫、約130種の鳥類の記録が残されている(国立科学博物館附属自然教育園, 2014)。

自然教育園において、ゲンジボタルが生息していることは、昔から知られているようであるが、観察・発生個体数の調査は1978年から始まり、2017年までの40年間の記録がまとめられた(矢野, 2018)。その中で1987年までは200個体ほどの発生数であったが、1988年には24個体と激減したために、保護・増殖計画が策定された。そして、個体数減少の原因究明、各地のホタル自然生息地・人工飼育施設の視察調査、ホタルの専門家による自然教育園の生息地視察・助言、野外保護・増殖施設の建設などが予定され、ホタル生息地の環境が整備された。現状では、50個体以下の数十個体で落ち着いているようである。

この間に、ゲンジボタルの発光の様子も調査されている。ゲンジボタルのオスが飛翔しながらメスを探すときの発光パターンは特徴的で、中部山岳地帯を境として、西日本と東日本で異なっていることが指摘されており、西日本では、その発光間隔が約2秒(2秒型)であ

るのに対して、東日本では約4秒(4秒型)である(大場, 1988, 1989, 2004)。自然教育園においては、1989年と2017年の調査では、2秒型が報告されている(矢野, 2018; 大場・鈴木, 2019)。この状況を受けて、1989年、2017年、2018年に保存されていたゲンジボタルの遺伝子解析(ミトコンドリアのCO II 遺伝子)が行われた。その結果、1989年のサンプル1個体が西日本地域由来の、2017年のサンプル1個体が中部地域由来の遺伝子型が認められた(大場・鈴木, 2019)。今回は、2019、2020年に捕獲したサンプルに、香川と徳島のサンプルも加えて解析したので報告する。

材料と方法

ゲンジボタル

解析には、2019年6月に自然教育園で採集したオス成虫4個体および2020年6月に採集したオス成虫3個体の合計7個体、また、香川県綾川町で2019年6月に採集したオス成虫2個体、徳島県吉野川市で2019年6月2日に採集したオス成虫16個体を用いた。これらの個体は、解析に供するまでエタノール中に保存されていた。

ミトコンドリアDNAの解析方法

1個体につき後脚2本から、QIAamp DNA mini kit (QIAGEN社)を用いて、取り扱い説明書のプロトコル(組織からのゲノムDNAの抽出)に従い、DNAを抽

*E-mail: suzunohiro@yahoo.co.jp

出した。抽出したDNAから、PCR (polymerase chain reaction) によって、ミトコンドリアの cytochrome oxidase II (CO II) 遺伝子領域を増幅した (Suzuki *et al.*, 2002)。増幅には次のプライマーを用いた。TL2-J-3037: 5'-ATGGCAGATTAGTGCAATGG-3' および TK-N-3785: 5'-GTTTAAGAGACCAGTACTTG-3' (Simon *et al.*, 1993)。増幅したCO II 遺伝子のPCR産物は、PCRに用いたプライマーと同じプライマーを用いて、BigDye terminator v3.1 cycle sequencing kit および Genetic analyzer 3500xL (ThermoFisher 社) を使用してダイレクトシーケンスを行い、塩基配列を決定した。

塩基配列を基に、6つの制限酵素 (*Ase* I, *Rsa* I, *Mva* I, *Hae* III, *Hinf* I, *Hpa* II) の切断サイトを確認し、ハプロタイプを決定した。なお、ハプロタイプの名称は、Suzuki *et al.* (2002) によった。

系統樹の作成には、Suzuki *et al.* (2002) によって報告されているゲンジボタルのCO II 遺伝子の塩基配列に、今回のデータを付け加えて行った。使用したソフトウェアは、MEGA X (Kumar *et al.*, 2018) で、得られた塩基配列の置換のモデルを検討したところ、G補正 (5 categories, +G; parameter = 0.1996) を行った Tamura 3-parameter model (Tamura, 1992) が最適と判断され

たので、このパラメーターを用いて、最尤法による系統樹を作成した。外群には、近縁種のクメジマボタル (*Luciola owadai*) を用いた。

結 果

表1には、ミトコンドリアCO II 遺伝子の塩基配列を基に制限酵素の切断サイトから決定したハプロタイプを示している。今回用いた自然教育園の2019年および2020年のサンプルは、全て関東地域でみられるC型の遺伝子型であった。なお、自然教育園での遺伝子分析のための採集記録は2018年以降であることから、大場・鈴木 (2019) の報告にある1989年および2017年のデータは含めずに解析を行った。表中の2018年のサンプルは大場・鈴木 (2019) のデータで、C型である。また、香川のサンプルはE型、徳島のサンプルはE型とU型であった。なおU型は、Suzuki *et al.* (2002) でクメジマボタルに当てがわれたU型ではなく、その後の調査で新たにゲンジボタルに当てがったものである。

図1の系統樹は、Suzuki *et al.* (2002) の系統樹に自然教育園と香川、徳島のサンプルを付け加えたものであ

表1. ミトコンドリアCO II 遺伝子の塩基配列を基に6つの制限酵素の切断サイトから決定したハプロタイプ。各制限酵素におけるアルファベットの小文字表現による型およびその組み合わせによるハプロタイプ (アルファベットの大文字表現による型) は、Suzuki *et al.*, (2002) の表記による。U型は初出。

個体番号	採集年	制限酵素						ハプロタイプ
		<i>Ase</i> I	<i>Rsa</i> I	<i>Mva</i> I	<i>Hae</i> III	<i>Hinf</i> I	<i>Hpa</i> II	
自然教育園 1 (2018)	2018	a	a	b	a	a	b	C
自然教育園 2 (2018)	2018	a	a	b	a	a	b	C
自然教育園 3 (2019)	2019	a	a	b	a	a	b	C
自然教育園 4 (2019)	2019	a	a	b	a	a	b	C
自然教育園 5 (2019)	2019	a	a	b	a	a	b	C
自然教育園 6 (2019)	2019	a	a	b	a	a	b	C
自然教育園 7 (2020)	2020	a	a	b	a	a	b	C
自然教育園 8 (2020)	2020	a	a	b	a	a	b	C
自然教育園 9 (2020)	2020	a	a	b	a	a	b	C
香川 1	2019	a	b	a	a	a	c	E
香川 2	2019	a	b	a	a	a	c	E
徳島 1	2019	a	b	a	a	a	c	E
徳島 2	2019	a	b	d	a	a	c	U
徳島 3	2019	a	b	a	a	a	c	E
徳島 4	2019	a	b	a	a	a	c	E
徳島 5	2019	a	b	d	a	a	c	U
徳島 6	2019	a	b	a	a	a	c	E
徳島 7	2019	a	b	d	a	a	c	U
徳島 8	2019	a	b	d	a	a	c	U
徳島 9	2019	a	b	d	a	a	c	U
徳島 10	2019	a	b	d	a	a	c	U
徳島 11	2019	a	b	d	a	a	c	U
徳島 12	2019	a	b	a	a	a	c	E
徳島 13	2019	a	b	a	a	a	c	E
徳島 14	2019	a	b	a	a	a	c	E
徳島 15	2019	a	b	d	a	a	c	U
徳島 16	2019	a	b	d	a	a	c	U

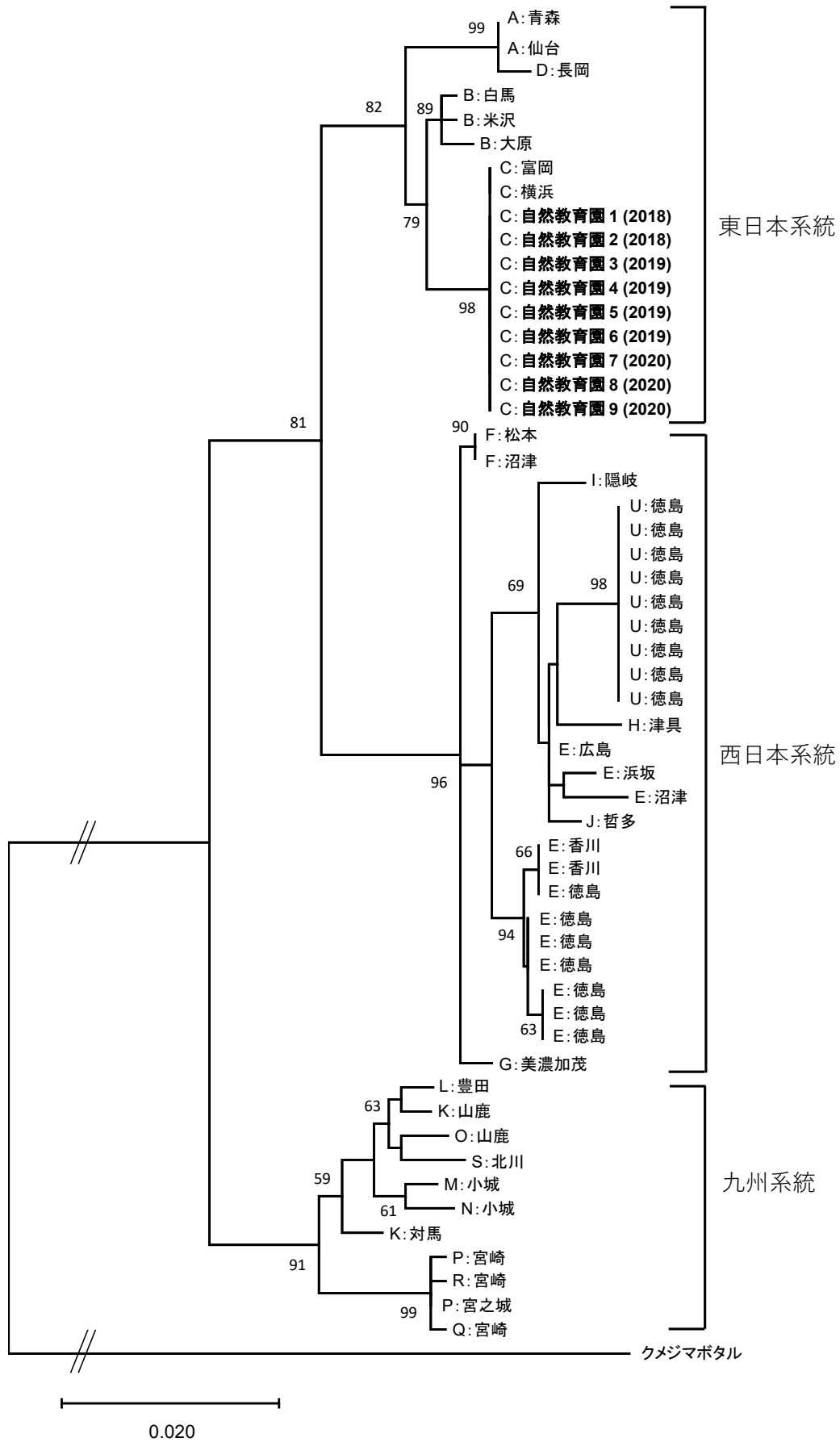


図 1. ゲンジボタルにおけるミトコンドリア CO II 遺伝子ハプロタイプの系統樹.

Tamura 3-parameter model (+G, parameter=0.1996) による最尤系統樹. 系統樹の枝の先端には, アルファベット表記のハプロタイプとその採集地が示してある. 自然教育園のハプロタイプは東日本地域の系統に含まれている.

る。各クラスターの根本の数字は、1000回のブートストラップ値で、枝のまとまりの信頼度を示すものであり、50%以下のものは示していない。系統樹の下スケールは2%の塩基差異を示している。大きく3つの系統（東日本系統、西日本系統、九州系統）が認められる。大場・鈴木（2019）の結果と同様に東日本系統の中には更に東北（AとD型）と関東（BとC型）の2系統、九州系統の中には北九州（K, L, M, N, O, S型）と南九州（P, Q, R）の2系統が認められている。しかし、西日本系統の中では、中部地域とそれ以外の地域を区別することはできなかった。

自然教育園のサンプルは、関東に分布するC型のクラスターを作り、東日本系統に含まれている。香川のサンプル（E型）は徳島のE型のサンプルとクラスターを作り、残りの徳島のサンプルはU型でクラスターを作り、両者ともに西日本系統に含まれている。

考 察

自然教育園での調査採集の記録がある2018年以降のサンプルでは、解析した限りにおいては（9個体）、すべて関東地域に代表される遺伝子型（C型）であった。大場・鈴木（2019）の報告では、1989年と2017年のサンプルから西日本地域に代表されるE型が見つかることと、自然教育園は、江戸時代には高松藩主（香川県）の松平讃岐守頼重の下屋敷で、当時、薬草園が設けられ、四国からハマクサギやトラノオスズカケなどの植物が導入された記録が残っていることから（矢野，2018）、ゲンジボタルも四国から持ち込まれた可能性を考慮して、香川と徳島のサンプルも併せて解析した。系統樹には示していないが、1989年のサンプルは、徳島のU型のサンプルのクラスターに入り、2017年のサンプルは西日本系統のクラスターに入っている。ここ数年、1日に20個体ほど観察される集団において、C型が優勢になってはいるが、置き換わっているかどうかは、判断できない。また、今回のミトコンドリアDNAのハプロタイプ解析は、母系の遺伝子型を反映しており、その個体が西日本と東日本系統間の交雑個体かどうかは分からない。

Kato *et al.* (2020) は、ゲノムDNAを制限酵素で切断して、その切断部位の近傍の塩基配列を決定して比較するRAD-Seq (Restriction Site Associated DNA Sequence) 法によって、ゲンジボタルの全ゲノムの数%の塩基配列を解析した。その結果、ミトコンドリア

DNAの解析と同様に3つの系統（東日本系統、西日本系統、九州系統）が認められたが、3系統の関係は、九州と西日本の系統がより近縁で、東日本系統が離れており、ミトコンドリアDNAでの関係とは異なっている。さらに、ゲノムの構成を見てみると、九州と西日本系統のゲノムを半分ずつ持つ個体が見られ、両者間で交雑が起こっていることを示しているが、西日本と東日本系統のゲノムを半分ずつ持つ個体は見られず、両者間での交雑は起こっていない可能性が示されている。ゲンジボタルの人為的な移植に伴うミトコンドリアDNAレベルでの遺伝的な攪乱の状況は、これまでいくつか報告されているが（鈴木，2009；木村ほか，2013）、自然教育園も含めて、両系統間での交雑が起こっているのか、いないのか、ゲノムレベルでの継続的な調査が求められる。

一方、発光パターンについては、発光間隔は温度に影響され、気温が高いと発光間隔は短く、気温が低いと長くなる。Iguchi (2010) は、気温の影響を考慮したうえで、発光間隔の速いタイプ（2秒型）、遅いタイプ（4秒型）そして中間型の3タイプを特定している。この発光パターンの違いは、ミトコンドリアDNA、ゲノムレベルでの遺伝的な違いに対応していると考えられているが（Suzuki *et al.*, 2002；Kato *et al.*, 2020）、中間型が両系統の交雑個体なのかどうか、野外での配偶行動の観察や室内での交雑実験を含め、ゲノムレベルでの調査が期待される。自然教育園においては、同一集団に2秒型と4秒型が認められている（矢野，2018；大場・鈴木（2019））。集団内における生態的な2型および遺伝的な2系統の間での交雑や両型の保有機構については、今後の課題である。

謝 辞

本研究を進めるに当たり、自然教育園での遺伝子解析のサンプルを調達して頂いた矢野亮氏（国立科学博物館附属自然教育園）、香川のサンプルを調達して頂いた川上洋一氏、徳島のサンプルを調達して頂いた武田彰仁氏（美郷ほたる館）に感謝の意を表す。また、本稿は大場信義博士（大場蛍研究所）との共著で準備をしていたが、2020年1月末日にご逝去されたので、編集規定により著者の単著とした。ご生前の先生からのご指導ご鞭撻に感謝の意を表す。

引用文献

- Iguchi, Y. 2010. Temperature-dependent geographic variation in the flashes of the firefly *Luciola cruciata* (Coleoptera: Lampyridae). *J. Nat. Hist.* 44 : 861-867.
- Kato, D., Suzuki H., Tsuruta, A., Maeda, J., Hayashi, Y., Arima, K., Ito, Y. & Nagano, Y. 2020. Evaluation of the population structure and phylogeography of the Japanese Genji firefly, *Luciola cruciata*, at the nuclear DNA level using RAD-Seq analysis. *Sci. Rep.* 10 : 1533.
- 木村和裕・日和桂正・草桶秀夫. 2013. ゲンジボタルの遺伝子解析による人為的放流か自然発生かの判別法. 全国ホタル研究会誌 (46) : 29-41.
- 国立科学博物館附属自然教育園. 2014. 自然教育園ガイドブック. 30pp.
- Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, C. & Tamura, K. 2018. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing platforms. *Mol. Biol. Evol.* 35 : 1547-1549.
- 大場信義. 1988. ゲンジボタル. 文一総合出版, 198pp.
- 大場信義. 1989. 西と東で異なるゲンジボタル. *昆虫と自然*, 24 (8) : 2-6.
- 大場信義. 2004. ホタル点滅の不思議—地球の奇跡—. 横須賀市自然人文博物館, 199pp.
- 大場信義・鈴木浩文. 2019. 自然教育園におけるゲンジボタルの発光行動と遺伝子解析. *自然教育園報告* (50) : 1-12.
- Simon, C., Frati, F., Beckenbach, A., Crespi, B., Liu, H. & Flook, P. 1994. Evolution, weighting, and phylogenetic utility of mitochondrial gene sequences and a compilation of conserved polymerase chain reaction primers. *Ann. Entomol. Soc. Am.* 87 : 651-701.
- Suzuki, H., Sato, Y. & Ohba, N. 2002. Gene diversity and geographic differentiation in mitochondrial DNA of the Genji firefly, *Luciola cruciata* (Coleoptera: Lampyridae). *Mol. Phyl. Evol.* 22 : 193-205.
- 鈴木浩文. 2009. ゲンジボタルにみる遺伝的多様性・固有性と人為的攪乱の状況—ホタル移植の三原則—. 月刊 海洋／号外 (51) : 21-30.
- Tamura, K. 1992. Estimation of the number of nucleotide substitutions when there are strong transition-transversion and G + C-content biases. *Mol. Biol. Evol.* 9 : 678-687.
- 矢野 亮. 2018. 自然教育園におけるゲンジボタル 40年間の観察記録. *自然教育園報告* (49) : 1-22.

